



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 100 41 221 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁷:
C 07 H 15/26
C 07 H 1/00

②1 Aktenzeichen: 100 41 221.1
②2 Anmeldetag: 22. 8. 2000
④3 Offenlegungstag: 14. 3. 2002

DE 100 41 221 A 1

⑦1 Anmelder:
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

⑦4 Vertreter:
Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea
Schüßler, 81825 München

⑦2 Erfinder:
Wießler, Manfred, Prof. Dr., 67227 Frankenthal, DE;
Kliem, Hans-Christian, Dr., 64646 Heppenheim, DE;
Sauerbrei, Bernd, Dr., 22763 Hamburg, DE

⑤6 Entgegenhaltungen:
DE 39 36 522 A1
ACS Symp. Ser., 1992, 494, 147-57;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤4 Verfahren zur Herstellung von wasserlöslichen Saccharidkonjugaten und Saccharidmimetika durch Diels-Alder-Reaktion und ihre Verwendung als Therapeutika oder Diagnostika
- ⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren mit dem Saccharid-Verbindungen auf sehr einfache Weise hergestellt werden können. Dieses Verfahren umfaßt die Schritte:
- (a) Anknüpfung mindestens eines Saccharids an ein cyclisches oder acyclisches Dien,
 - (b) Umsetzung des in Schritt (a) entstandenen Saccharid-enthaltenden Diens oder eines käuflich erhältlichen Saccharid-enthaltenden Diens mit einem Dienophil mittels Diels-Alder-Reaktion.

DE 100 41 221 A 1

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Substanzbibliotheken auf der Grundlage von natürlich vorkommenden Sacchariden und Saccharidmimetika.

- 5 [0002] Es ist bekannt, daß die Interaktionen zwischen Proteinen und natürlichen oder synthetischen Oligosacchariden hochspezifisch sind. An diesen Interaktionen sind im wesentlichen Wasserstoffbrückenbindungen, wechselseitig vorhandene Donoren und Acceptoren sowie hydrophobe Wechselwirkungen beteiligt. Die dabei erreichten Bindungskonstanten sind allerdings um mehrere Größenordnungen geringer als diejenigen, die bei Antigen-Antikörper Interaktionen gemessen werden. Um auf der Basis von Sacchariden eine Optimierung der genannten Wechselwirkungen durchführen zu können, 10 müssen und alle Arten von Wechselwirkungen zuzulassen, müssen eine große Anzahl substituierter Saccharide und Saccharidmimetika ausprobiert werden und synthetisiert werden. Die Grundidee dabei ist die Entwicklung von wirkungsvollen Therapeutika auf Saccharidbasis. Ein großes Problem bei der Synthese von Saccharid(e)-enthaltenden Verbindungen ist allerdings die komplizierte mehrstufige Verfahrensdurchführung, die zusätzlich noch eine ausgeprägte Schutzgruppenchemie verlangt. Dies gilt insbesondere, wenn mehrere Saccharide in bzw. an eine Verbindung synthetisiert werden sollen oder Saccharid-Bibliotheken aufgebaut werden sollen. Es besteht deshalb der dringende Bedarf nach einem Verfahren mit dem auf einfache Weise auch kompliziert aufgebaute Saccharid(e)-enthaltende Verbindungen synthetisiert werden können. Speziell ist daran gedacht mit dem Verfahren Saccharid-Cluster aufbauen zu können, die sich als Therapeutika eignen, weil sie mit Rezeptoren in bzw. auf Zellen oder Organen wechselwirken. Desweiteren sollen damit Saccharid-Bibliotheken und Saccharid-enthaltende Verbindungsbibliotheken aufgebaut werden. Ferner soll sich das Verfahren 20 eignen, um Saccharide mit Peptiden, Nucleinsäuren und/oder Lipiden zu verknüpfen, wobei auch eine Verknüpfung der Polymere untereinander möglich sein soll.

[0003] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem auch kompliziert aufgebaute Saccharid-Verbindungen oder Bibliotheken, wie vorstehend erwähnt, aufgebaut werden können.

[0004] Diese Aufgabe wird durch die Gegenstände der Patentansprüche gelöst.

- 25 [0005] Von den Erfindern wurde ein Verfahren zur Synthese von Saccharid-Verbindungen entwickelt, das die folgenden Schritte aufweist:

- (a) Anknüpfung mindestens eines Saccharids an ein cyclisches oder acylisches Dien,
 (b) Umsetzung des in Schritt (a) entstandenen Saccharidenthaltenden Diens oder eines käuflich erhältlichen saccharidhaltigen Diens mit einem Dienophil mittels Diels-Alder-Reaktion. 30

- [0006] Die Diels-Alder-Reaktion ist eine Reaktion, bei der ein Dien mit einem Olefin reagiert, wobei ein Übergangszustand durchlaufen wird, an dem 6π -Elektronen beteiligt sind. Dieser Übergangszustand verleiht den Diels-Alder-Reaktionen, im Vergleich zu den üblichen organischen Reaktionen, relativ niedrige Aktivierungsenergien, so daß diese Reaktionen bereits bei Raumtemperatur oder leicht erhöhten Temperaturen ablaufen können. Diels-Alder-Reaktionen können durch hohen Druck beschleunigt werden. Gerade in den letzten Jahren sind eine Reihe von Katalysatoren bekannt geworden, die in der Lage sind, unter milden Bedingungen effektiv Diels-Alder Reaktionen zu katalysieren (K. Pindur et al., Chem. Rev. 1993, 93, S. 741–761; Kündig et al., Angew. Chem. 1999, 111, S. 1298–1301). Da Diels-Alder Reaktionen grundsätzlich reversibel sind, eignet sich dieser Reaktionstyp auch für die dynamische kombinatorische Chemie. Die Bildung von exo- und endo-Isomeren kann über die Temperatur und auch den Katalysator gesteuert werden. Hinsichtlich der Ausbeuten bietet die Diels-Alder Reaktion große Vorteile, da sie ohne weitere Nebenprodukte und mit nahezu quantitativer Ausbeute verläuft. Die Diels-Alder Reaktion wird daher von den Erfindern eingesetzt, um kompliziert aufgebaute Saccharid-Verbindungen und Bibliotheken aus Saccharid-enthaltenden Verbindungen bzw. Saccharid-Bibliotheken aufzubauen. Bei geschickter Substitution der beiden Ausgangsverbindungen (Dien und Dienophil) mit funktionellen Gruppen oder Resten sind damit Moleküle zugänglich, die drei oder sogar vier unterschiedliche Reste enthalten können. 40

- [0007] Erfindungsgemäß eignen sich als cyclische Dien-Komponente in Schritt (a) vorzugsweise Furan, Fulven, Furfural, Cyclopentadien, Cyclohexadien, Pyrrol, 1,3-Oxazol, 1,2-Oxazol, Pyrazol, Thiophen und als acyclische Verbindungen 1,3-Diene (z. B. trans-trans Hexadien-2,4-1,6-diol), welche mit funktionellen Gruppen ein- oder mehrfach substituiert sein können. Die funktionellen Gruppen können ausgewählt sein aus beispielsweise Alkylketten (C_2 - C_{20} , bevorzugt Methyl, Ethyl, iso-Propyl, Tert.-Butyl usw.), OH, SH, Halogene, Aryl-, Carboxyl-, Nitro-, Carboxyamido-, Keto-, Sulf-oxid-, Sulfon-, Sulfonsäure-, Phosphorsäure- oder Amino-Gruppen, die direkt oder über Alkylreste gebunden sind. Die Dien-Komponente kann aber auch Aminosäure-, Peptid-Substituenten, Lipid-Substituenten oder Oligonukleotid- bzw. Nukleinsäure-Substituenten tragen. An die Dien-Komponente lassen sich auch alle Arten pharmazeutischer Wirkstoffe, Markierungen, Farbstoffe oder Komplexe (z. B. Carboran, Ferrocen) koppeln. 45

- [0008] Bevorzugte Dien-Komponenten sind: Bishydroxyalkylfurane, wie 2,3-Bishydroxymethylfuran, 3,4-Bishydroxymethylfuran, 2,5-Bishydroxymethylfuran, Hydroxymethylfurfural, α -GMF (α -Glycosylmethyl-furfural; bzw. mit z. B. $NaBH_4$ reduzierter Aldehydfunktion). Ebenso können natürlich auch deren Homologe mit Ethyl- oder Propylgruppe statt Methyl- eingesetzt werden. 50

- [0009] Die Dien-Komponenten sind käuflich erhältlich z. B. Fa. Aldrich (Furfural = Aldrich #27,886-6; Hydroxymethylfurfural = Aldrich #4,080-7; 3-Hydroxymethylfuran = Aldrich #19,639-8) oder Fa. Südzucker AG (α -GMF). Allgemein gilt, daß 2,5-disubstituierte Furane in Diels-Alder-Reaktionen eine geringere Reaktivität besitzen als 3,4-Disubstituierte. Diese abgestufte Reaktivität läßt sich synthetisch nutzen. Dabei ist von Vorteil, daß sich die Reaktivität von Hydroxymethylgruppen in den einzelnen Positionen des Furans unterscheidet, so daß eine sequentielle Substitution möglich wird. Damit lassen sich sehr einfach verschiedene Saccharide in das Furan einführen (s. Fig. 1). 55

- [0010] Im Schritt (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Saccharid mit einem Dien verknüpft, indem das Dien mit einer Imidat-Komponente umgesetzt wird, die mit einem Saccharid substituiert ist. Die Reaktionsbedingungen für diese Reaktion sind beispielsweise von R. R. Schmidt, in: Glycosciences, ed. H. J. Gabius, S. Gabius, S. 31–53 beschrieben worden. Die Verknüpfung des Saccharids mit der Dien-Komponente kann auch mittels anderer Reaktionen (z. B. 60

mittels der bekannten Königs-Knorr-Reaktion) erfolgen. Der Begriff "Saccharid" umfaßt Saccharide jeglicher Art, insbesondere Mono-, Di-, Oligo- oder Polysaccharide (z. B. mono-, di-, tri-, multi-antennäre sowie dendritische Saccharide) in allen stereoisomeren und enantiomeren Formen. Diese können Pentosen oder Hexosen sein, welche in der L- oder D-Form vorliegen. Als Monosaccharide sind insbesondere Glucose, ganz besonders α - und β -D-Glucose, Fructose, Galactose, Mannose, Arabinose, Xylose, Fucose, Rhamnose, Digitoxose und Derivate davon bevorzugt. Als Disaccharide eignen sich insbesondere Saccharose, Maltose, Laktose oder Gentobiose, entweder 1,4- oder 1,6-verknüpft, sowie Derivate davon. Als Saccharide gelten hier auch Zuckeralkohole, Polyole, Inositol und Derivate davon, ganz besonders cis-Inositol, epi-Inositol, allo-Inositol, myo-Inositol, muco-Inositol, chiro-Inositol, neo-Inositol, scyllo-Inositol, Pinpoltitol, Streptamin, Quercitol, Chinasäure, Shikimisäure, Conduritol A bzw. B, Validatol und Quebrachitol, z. B. aus Galactinolen, sowohl aus pflanzlichen Quellen, wie Zuckerrüben (daraus erhältlich: Hydroxymethylfurfural; F. W. Lichtenthaler, Mod. Synth. Meth. 1993, 6, S. 273-376), als auch aus Milchprodukten, oder durch enzymatische Enantiomerentrennung gewonnene Verbindungen. Ferner sind erfindungsgemäß einsetzbare Saccharide Glycokongjugate. Diese können Kongjugate von z. B. Sacchariden mit Peptiden, Lipiden, Säuren (\rightarrow Ester), Alkylresten (\rightarrow Ether), Heterozyklen oder anderen Kohlenhydraten sein. Ein Beispiel von Glycokongjugaten ist Z1-Z10, ein Gemisch von 10 Glycokongjugaten. Bei den Verbindungen Z1-Z10 handelt es sich um in der Natur vorkommende Glycopeptide, Glycoproteine und Lipopolysaccharide. Derivate der erwähnten Saccharide sind z. B. mit Schutzgruppen (z. B. Benzoyl-, Silyl-, Dimethoxytrityl-) geschützte Saccharide und/oder mit funktionellen Gruppen, wie Amino-, Nitro-, Carboxy-, Carboxyamido-, Keto-, Sulfoxid-, Sulfon-, Sulfonsäure-, Phosphorsäure-, Phosphonsäure-, Mono/Di/Trialkylamidgruppen oder Halogenidgruppen, modifizierte Saccharide. Vorstehende Saccharide können natürlich vorkommen oder synthetisch hergestellt sein. Vorzugsweise weist das Imidat nur ein Saccharid auf, aber auch eine Anzahl von 2, 3, 4, 5 und 6 Saccharid-Komponenten ist denkbar, wenn das Imidat entsprechend ausgewählt ist. Die Saccharide können dabei gleich oder verschieden voneinander sein.

[0011] Bevorzugte Saccharid-substituierte Imidat-Komponenten sind Tri-O-Benzoylfucoseimidat oder Tetra-O-Benzoylgalactoseimidat. Die Saccharid-substituierten Imidat-Komponenten werden beispielsweise gemäß H. Paulsen et al., 1992, Liebig's Ann. Chem. 747-750 hergestellt.

[0012] Um in Schritt (a) ein vollständig mit Sacchariden modifiziertes Dien zu erhalten, kann die vorbeschriebene Reaktion des Diens mit dem Saccharid-substituierten Imidat mehrfach hintereinander stattfinden (s. Beispiel 1) oder das Imidat wird im Überschuß zugesetzt, wobei dann nach der Reaktion ein- und mehrfach Saccharid-modifiziertes Dien voneinander zu trennen werden sollten, um im nachfolgenden Schritt (b) zu einheitlichen Produkten zu kommen. Die in Schritt (a) aus den vorstehend als bevorzugt genannten Dienen und Saccharid-substituierten Imidaten herstellbaren Verbindungen sind beispielsweise 3,4-Bis-(fucosyl-oxymethyl)-furan, 3,4-Bis-(galactosyl-oxymethyl)-furan, 3-Fucosyloxymethyl-4-galactosyloxymethylfuran, 2,5-Bis-galactosyloxymethyl-furan, 2,5-Bis-fucosyloxymethyl-furan, 2-Fucosyloxymethyl-5-galactosyloxymethylfuran und Alkohole, abgeleitet von Furan-2,5-di- β -propionsäure oder abgeleitet von Furan-2,5-di-essigsäure. Falls die Verbindungen Schutzgruppen enthalten (vorzugsweise: Benzoylschutzgruppe) können diese z. B. mit Natriummethanolatlösung gemäß Standardverfahren abgespalten werden.

[0013] In Schritt (b) eignen sich als Dienophile Maleinsäure(anhydrid)-Derivate, Fumarsäure(anhydrid)-Derivate, Maleinimid-Derivate (bevorzugt: N-substituiertes Maleinimid), Acrylsäure-Derivate, Acetylen-Derivate, Butindicarbonsäure bzw. dessen Derivate oder Enoether. Unter Derivaten sind dabei jene, die nach Substitution der genannten Verbindungen Alkylketten (C_2 - C_{20}), OH, SH, Halogenen, Aryl-, Carboxy-, Nitro-, Carboxyamido-, Keto-, Sulfoxid-, Sulfon-, Sulfonsäure-, Phosphorsäure-, Amino-, Phosphonsäure- oder Mono/Di/Trialkylamid-Gruppen tragen. Desweiteren kann die Dienophil-Komponente mit Sacchariden gemäß der vorstehenden Definition substituiert sein. Die Dienophil-Komponente kann aber auch Aminosäure-, Peptid-Substituenten, Lipid-Substituenten oder Oligonukleotid- bzw. Nukleinsäure-Substituenten tragen. An die Dienophil-Komponente lassen sich auch alle Arten pharmazeutischer Wirkstoffe, Markierungen, Farbstoffe oder Komplexe koppeln. Bevorzugte Dienophile sind Tris-(2-Maleinimidoethyl)amin (TMEA), N-Phenyl, N-Ethyl, Maleinimidolysin oder Conduritol.

[0014] Die Dien- als auch die Dienophil-Komponente können einzeln oder beide auch aromatische oder heterozyklische Reste enthalten. Diese können ausgewählt sein aus: Phenyl-, Thienyl-Thiophenyl-, Furyl-, Furanyl-, Pyranyl-, Pyrrol-, Imidazolyl-, Pyrazolyl-, Pyridyl-, Pyrazinyl-, Pyrimidinyl-, Pyrazinyl-, Pyridazinyl-, Thiazolyl-, Oxazolyl-, Indolyl-, Furazannyl-, Pyrrolinyl-, Imidazolinyl-, Pyrazolinyl-, Thiazolinyl-, Triazolyl-, Tetrazolyl-Gruppe, sowie die Positionsisomeren des oder der Heteroatome, die diese Gruppen umfassen können, ein Rest bestehend aus carbocyclischen kondensierten Ringen, beispielsweise die Naphthylgruppe oder die Phenanthrenylgruppe, ein Rest bestehend aus kondensierten heterocyclischen Ringen, beispielsweise Benzofuranyl, Benzothienyl, Benzimidazolyl, Benzothiazolyl, Naphtho[2,3-b]thienyl, Thianthrenyl, Isobenzofuranyl, Chromenyl, Xanthenyl, Phenoxathiinyl, Indolizinyll, Isoindolyl, 3H-Indolyl, Indolyl, Indazolyl, Purinyl, Chinolizinyll, Isochinolyl, Chinolyl, Phthalzinyll, Naphthyridinyll, Chinoxalinyll, Chinazolinyll, Chinolinyll, Pteridinyll, Carbazolyl, β -Carbolinyll, Cinnolinyll, Acridinyll, Phenazinyll, Phenothiazinyll, Phenoxazinyll, Indolinyll, Isoindolinyll, Imidazopyridyl, Imidazopyrimidinyl oder auch die kondensierten polycyclischen Systeme bestehend aus heterocyclischen Monozyklen, wie beispielsweise vorstehend definiert, wie beispielsweise Thionaphthenyl, Furo[2,3-b]pyrrol oder Thieno[2,3-b]furan, und insbesondere die Phenyl-Furylgruppen, wie 2-Furyl, Imidazolyl, wie 2-Imidazolyl, Pyridyl, wie 2-Pyridyl, 3-Pyridyl, 4-Pyridyl, Pyrimidinyl, wie Pyrimid-2-yl, Thiazolyl, wie Thiazol-2-yl, Thiazolinyl, wie Thiazolin-2-yl, Triazolyl, wie Triazolyl-2-yl, Tetrazolyl, wie Tetrazol-2-yl, Benzimidazolyl, wie Benzimidazol-2-yl, Benzothiazolyl, Benzothiazol-2-yl, Purinyl, wie Purin-7-yl, oder Chinolyl, wie 4-Chinolyl.

[0015] Die Diels-Alder-Reaktion ist ein Standardverfahren der organischen Chemie und die Reaktionsbedingungen sind einem Fachmann wohl bekannt bzw. können in einschlägigen Lehrbüchern nachgeschaut werden. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird die Diels-Alder-Reaktion vorzugsweise in beliebigen Lösungsmitteln zwischen 20° und 100°C durchgeführt. Bevorzugte Lösungsmittel sind Wasser oder Alkohole, wie Methano oder Ethanol. Die Bildung von exo- und endo-Verbindungen, wie sie bei diesem Typ von Diels-Alder-Reaktionen beobachtet werden, kann durch die experimentellen Bedingungen gesteuert werden und vergrößert die Zahl der zu erhaltenden Verbindungen um den Faktor zwei. Diese Variation der experimentellen Bedingungen liegt im Können eines Durchschnittsfachmanns.

[0016] Alle Diels-Alder-Reaktionen sind Gleichgewichtsreaktionen, bei denen in Abhängigkeit von der Temperatur

auch immer auch die Komponenten zugegen sind und somit anderweitig aus dem Gleichgewicht heraus mit anderen Partnern abreagieren können. Damit eignet sich das vorstehend beschriebene System auch zur kontrollierten Freisetzung der Dienophil-Komponente, bei gleichzeitiger Verankerung der Dien-Komponente an einem Polymerträger oder umgekehrt. Trägt das Dienophil z. B. ein Peptid oder ein Therapeutikum so steht damit ein System zur Verfügung, das für die kontrollierte und steuerbare Freisetzung von Arzneimitteln von einer Festphase genutzt werden kann. In Erweiterung vorstehend beschriebener Reaktionen steht mit dem erfindungsgemäßen Verfahren eine Möglichkeit der Verknüpfung von Peptiden mit Sacchariden, von Peptiden mit Nukleinsäuren, von Sacchariden mit Nukleinsäuren und der jeweiligen Komponente mit sich selbst zur Verfügung, sofern die eine Komponente mit einem Dien und die andere mit einem Dienophil verbunden wäre. Die entstandenen Diels-Alder Addukte können selbst noch abgewandelt werden, z. B. durch Ringöffnung des Anhydridringes oder auch durch Hydrierung der Doppelbindung oder durch Additionsreaktionen an diese Doppelbindung.

[0017] Das Oxa-bicycloheptan-Ringsystem kann unter sauren Bedingungen zu einem Cyclohexan-Ringsystem geöffnet werden. Dabei ist eine Spaltung des Diels-Alder Addukts in die Komponenten nicht mehr möglich und es entsteht ein neuer Strukturtyp, ein Inositolderivat, das sicher andere pharmakologische Eigenschaften aufweist, da es nicht mehr die Rigidität des Bicyclus besitzt.

[0018] Um größere Cluster oder Bibliotheken aufzubauen, müssen die Schritte a) und/oder b) des erfindungsgemäßen Verfahrens mehrmals hintereinander durchgeführt werden.

[0019] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann Schritt a) natürlich weggelassen, wenn von einem Saccharid-substituierten Dien ausgegangen wird.

[0020] Nachfolgend sollen einige wichtige Aspekte der vorliegenden Erfindung hervorgehoben werden, wobei diese nicht als Beschränkung des breiten Verfahrenskonzepts auszulegen sind.

[0021] Wird als Dien ein zweifach mit Zuckerresten substituiertes Furan und als Dienophil ein N-substituiertes Maleinimid eingesetzt, das über einen Spacer beliebiger Länge ein Saccharid trägt, so entstehen bei der Diels-Alder-Reaktion Trisaccharide. Nach diesem Schema läßt sich bei der Verwendung von z. B. zehn unterschiedlichen Saccharidmischungen eine Bibliothek mit fast 1000 verschiedenen Trisacchariden generieren. Da die Schutzgruppen sowohl des Diens als auch des Dienophils vorher abgespalten werden können, kann die Diels-Alder-Reaktion in Wasser durchgeführt werden, was sich günstig auf die Reaktionsgeschwindigkeit und Ausbeute auswirkt (s. Fig. 2).

[0022] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich Substanzen/Bibliotheken herstellen, die sich eignen, die Interaktion von Lektinen mit Proteinen zu inhibieren. Solche Substanzen können bei der Krebstherapie zur Vermeidung der Metastasierung oder als Entzündungshemmer Verwendung finden. Bei Verwendung von Spacern, wobei diese sowohl im Dien als auch im Dienophil eingefügt werden können, oder von seltenen oder mit ungewöhnlichen funktionellen Gruppen versehenen Sacchariden, erhöht sich die Diversität der Bibliotheken. Die Multiantennarität, die für die Interaktion von Sacchariden mit Lektinen von Bedeutung sein kann, läßt sich ebenfalls mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens herstellen. Durch die zwei- oder dreifache Diels-Alder-Reaktion mit einem entsprechenden Dienophil sind solche Moleküle leicht zugänglich (s. Fig. 3).

[0023] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren sind auch Verbindungen/Bibliotheken generierbar, die neben den Sacchariden auch andere pharmakophore Gruppen enthalten, um allgemein neue Leitstrukturen für Therapeutika zugänglich zu machen. Solche Gruppen können Heterozyklen, Aromaten oder auch peptidische Strukturen sein, die entweder im Dien oder im Dienophil enthalten sind. Durch diese vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten erhöht sich die Diversität der Bibliotheken beträchtlich. Günstig kann in diesem Zusammenhang auch die oft geringe konformative Beweglichkeit der entstehenden Diels-Alder-Produkte sein, da sich solche Strukturen besser an Rezeptoren anlagern. Durch das Vorhandensein der Saccharidreste in den Produkten sind diese entsprechend wasserlöslich.

[0024] Die Diels-Alder-Reaktion von Dienen mit Dienophilen (z. B. substituierten Maleinimiden) kann auch zur Verbindung von Proteinen mit Sacchariden und von Sacchariden mit Nukleinsäuren eingesetzt werden. Hier ist es zweckmäßig, einen Lysinrest im Protein zu haben, der über die freie Aminogruppe die Anfügung des Maleinimid-Restes gestattet. Es ist aber auch denkbar, daß am aminoterminalen Ende ein Lysin-Rest angefügt wird. Bei diesen so zugänglichen Neo-Glycoproteinen läßt sich der Einfluß von unterschiedlichen (Oligo)sacchariden auf die Wirksamkeit der Proteine oder deren Pharmakokinetik untersuchen. Auf dem gleichen Weg ist auch eine Markierung von Sacchariden mit Biotin problemlos durchführbar, was für eine mögliche Diagnostik auf der Basis von Lektin-Saccharid-Wechselwirkungen von Wichtigkeit wäre (Fig. 2).

[0025] Die Diels-Alder-Reaktion von Dienen (z. B. substituierten Furanen) mit Dienophilen (z. B. substituierten Maleinimiden) führt auch zur Dotierung von Oberflächen mit Sacchariden, Lipiden, Peptiden oder (Oligo)nukleotiden. Dabei kann sowohl das Dienophil als auch das Dien auf der Oberfläche immobilisiert sein. Eine Anwendung in der Chip-Technologie ist somit denkbar. Auch die Erhöhung der Beladungsdichte auf der Oberfläche ist durch die Verwendung von Strukturen wie in Fig. 2 machbar.

[0026] Da die Diels-Alder-Reaktion mit diesen Komponenten sehr gut in Wasser durchzuführen ist und in der Regel keiner Katalyse bedarf, können alle Komponenten ohne Schutzgruppen miteinander umgesetzt werden. Dadurch entfällt die finale Abspaltung von Schutzgruppen, ein Prozeß der oftmals große Schwierigkeiten bereitet.

[0027] Da alle Diels-Alder-Reaktionen reversibel sind und sich die Gleichgewichte schon bei Raumtemperatur einstellen, kann die Umkehrung der Adduktbildung auch für die kontrollierte Freisetzung der Komponenten der Diels-Alder-Reaktion, die dafür mit Wirkstoffen beladen sind, eingesetzt werden.

[0028] Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, sind die natürlichen Bindungskonstanten zwischen Proteinen und (Oligo)sacchariden nicht sehr hoch. Offenbar bestand im Rahmen der Evolution kein Bedarf für eine weitere Optimierung dieser Bindungskonstanten. Aus grundsätzlichen Erwägungen heraus sollte es möglich sein, durch Zulassung aller Arten von Wechselwirkungen einschließlich ionischer Interaktionen, auf der Basis von Sacchariden und Saccharidmimetika wirkungsvolle Agonisten und Antagonisten von Rezeptoren in Analogie zu Peptiden darzustellen. Die Verwendung von substituierten Sacchariden, wobei alle Arten von funktionellen Gruppen eingesetzt werden können, auch solche, die bisher nicht in Sacchariden vorkommen, ist sicher eine Voraussetzung für diese Optimierung.

[0029] Mit Hilfe der kombinatorischen Chemie ist es möglich, sehr wirkungsvolle Agonisten und Antagonisten auf der Basis von Peptiden, Lipiden oder Nukleinsäuren zu identifizieren. Um daraus Therapeutika, vor allem für die orale Applikation, zu entwickeln, bedarf es aber Substanzen, die oral verfügbar sind. Eine notwendige Voraussetzung dafür ist die ausreichende Wasserlöslichkeit. Ein möglicher Ansatz zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit und damit der oralen Verfügbarkeit, ist die kovalente Verknüpfung von Wirkstoffen mit Sacchariden unter Bildung von Konjugaten. Mit dem erfindungsgemäßen Ansatz ist es möglich, unter Anwendung eines kombinatorischen Ansatzes von vornherein das Problem einer ausreichenden Wasserlöslichkeit durch die Verwendung geeigneter Bausteine zu berücksichtigen. Dies bietet darüber hinaus noch den Vorteil, daß diese Bausteine auf der Basis von Sacchariden und ihrer Derivate Teil des Wirkstoffs werden und damit zur Stärkung der Bindung des Wirkstoffs an sein Target beitragen können. Von den Erfindern ist auch daran gedacht worden, das Verfahren auf die Festphase zu übertragen, wobei sinnvollerweise die Bindung an die Festphase über den Saccharidteil erfolgt.

[0030] Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Figuren beschrieben.

[0031] Fig. 1 Einführung von 2 Saccharidresten in ein Furansystem

[0032] Fig. 2 Reaktion eines zweifach substituierten Furans mit einem N-substituierten Maleinimid

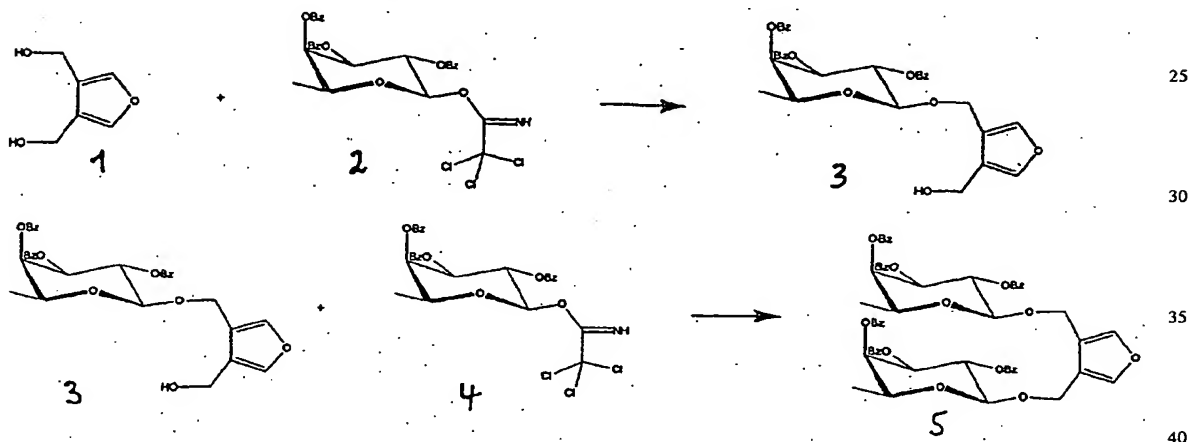
[0033] Fig. 3 Mehrfache Diels-Alder-Reaktion

[0034] Fig. 4 Exemplarische Bausteine für die Diels-Alder Reaktion

[0035] Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Beispiele verdeutlicht.

Beispiel 1

Synthese von glycosidierten Hydroxymethylfuranen



[0036] 20 mmol 3,4-Bis-Hydroxymethylfuran 1 und 21 mmol Tri-O-Benzoyl-fucose-imidat 2 werden in 300 ml Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird auf -40°C abgekühlt und mit einigen Tropfen Triflat versetzt. Die Reaktionslösung wird dann im Eisbad 1 Stunde gerührt, die organische Phase wird mit verdünnter Bicarbonatlösung und dann mit Wasser ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedunstet. Das Reaktionsprodukt 3 wird nach Säulenchromatographie an Kieselgel mit Petrolether/Essigester (2/1) in einer Ausbeute von ca. 60% erhalten.

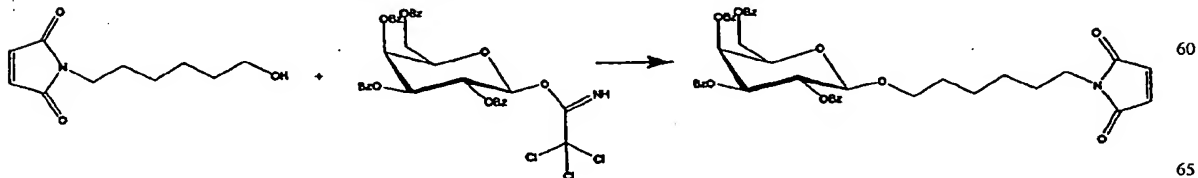
[0037] 6 mmol Mono-fucosyliertes Furan 3 wird mit 6.3 mmol Imidat 4 wie oben beschrieben umgesetzt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Essigester (2/1). Das Produkt 5 wird in einer Ausbeute von ca. 55% erhalten.

[0038] Zur Entschüttung (Abspaltung der Benzoylgruppen) wurde das Produkt 5 mit Natriummethanolatlösung umgesetzt. Ausbeuten: ca. 60%.

[0039] Um die entsprechenden 2,5-Produkte herzustellen, wird im ersten Schritt statt 3,4-Bis-Hydroxymethylfuran das 2,5-Bis-Hydroxymethylfuran eingesetzt und analog wie vorstehend verfahren.

Beispiel 2

Glycosidierung von Maleinimid bzw. -Derivaten



[0040] 5 mmol geeignet derivatisiertes Maleinimid 1 (Maleinimid + Spacer + OH) werden mit 4.9 mmol Galactosylimidat 2 in 100 ml Dichlormethan gelöst und bei -40°C mit 10 Tropfen Triflat versetzt. Es wird bei 0°C gerührt. Nach voll-

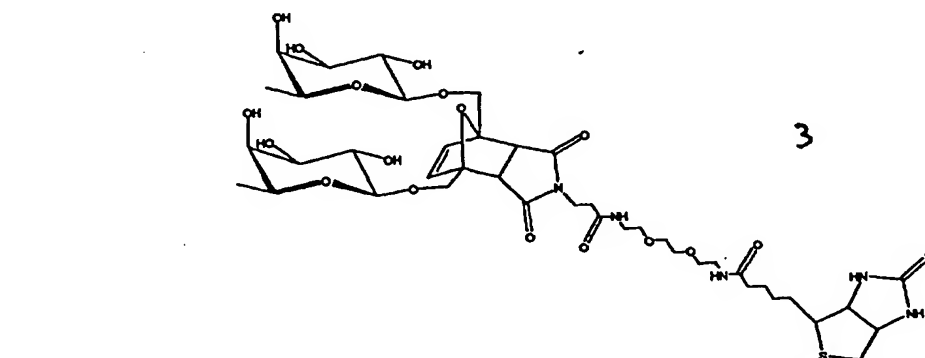
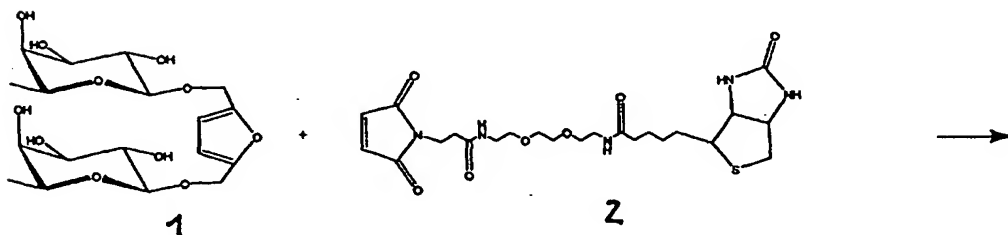
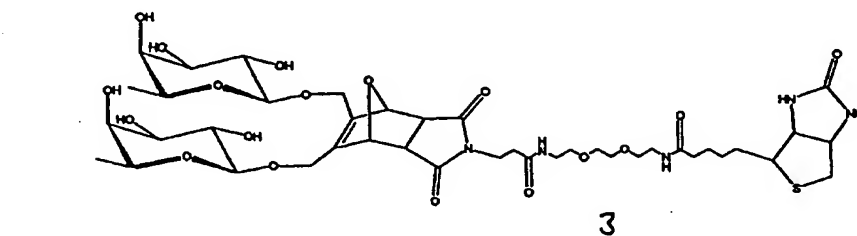
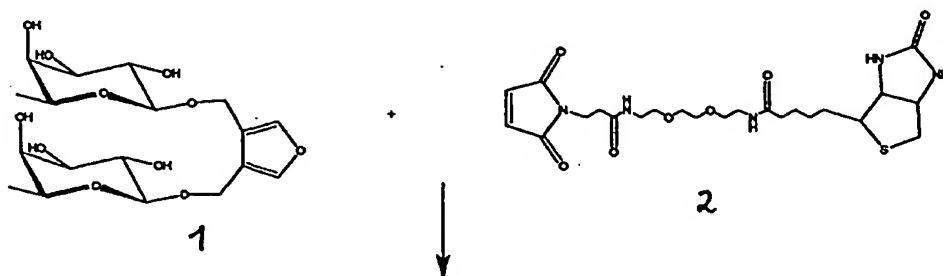
ständiger Umsetzung wird die Reaktionslösung mit verdünnter Bicarbonatlösung und Wasser ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird an Kieselgel mit Petrolether/Essigester (2/1) chromatographiert. Ausbeute an Produkt 3: 54%.

[0041] Zur Abspaltung der Benzoylgruppen wird mit Natriummethanolat oder einer Mischung aus Methanol/Wasser/Triethylamin umgesetzt.

Beispiel 3

Diels-Alder Reaktion

a) Biotinylierung



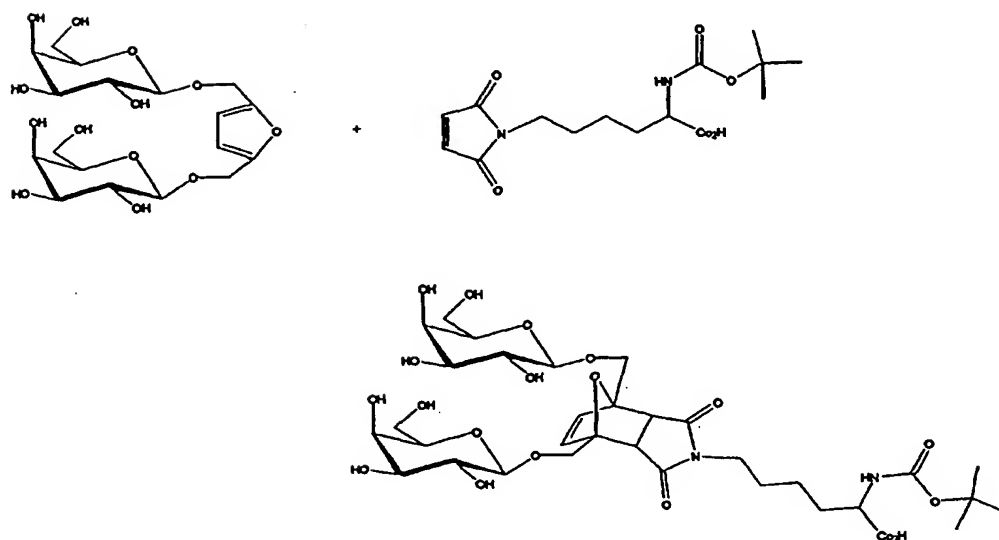
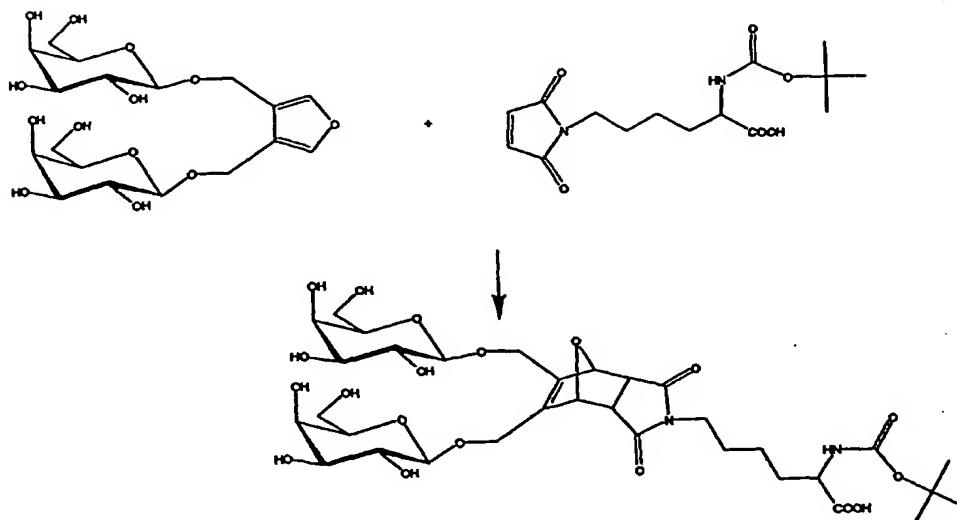
50 μ mol glycosidiertes Furan 1 (s. Beispiel 1) und 50 μ mol Biotinderivat 2 (Fa. Pierce, Kat.-No. 2 1900 ZZ) werden

DE 100 41 221 A 1

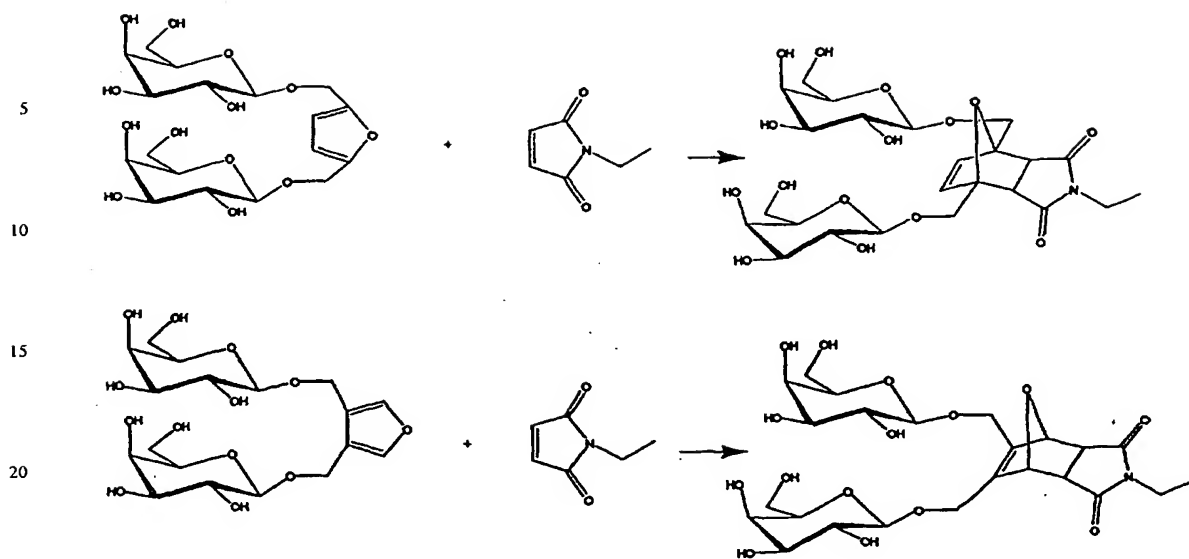
in 1 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird bei Raumtemperatur gerührt. Der Fortgang der Reaktion wird mittels HPLC kontrolliert. Nach beendeter Umsetzung wird die Reaktionslösung gefriergetrocknet. Das Produkt 3 (endo-/exo-Mischung) wird mittels präparativer HPLC isoliert. Ausbeute 50–60%.

b) Unter den gleichen Bedingungen wurden auch folgende Reaktionen durchgeführt, wobei die Dien-Komponente jeweils gemäß Beispiel 1 hergestellt wurde und die Dienophil-Komponente gemäß K. Wakisaka et al., J. Med. Chem. 1997, 40, S. 2643–2652 hergestellt wurde.

Einführung eines Lysinrestes

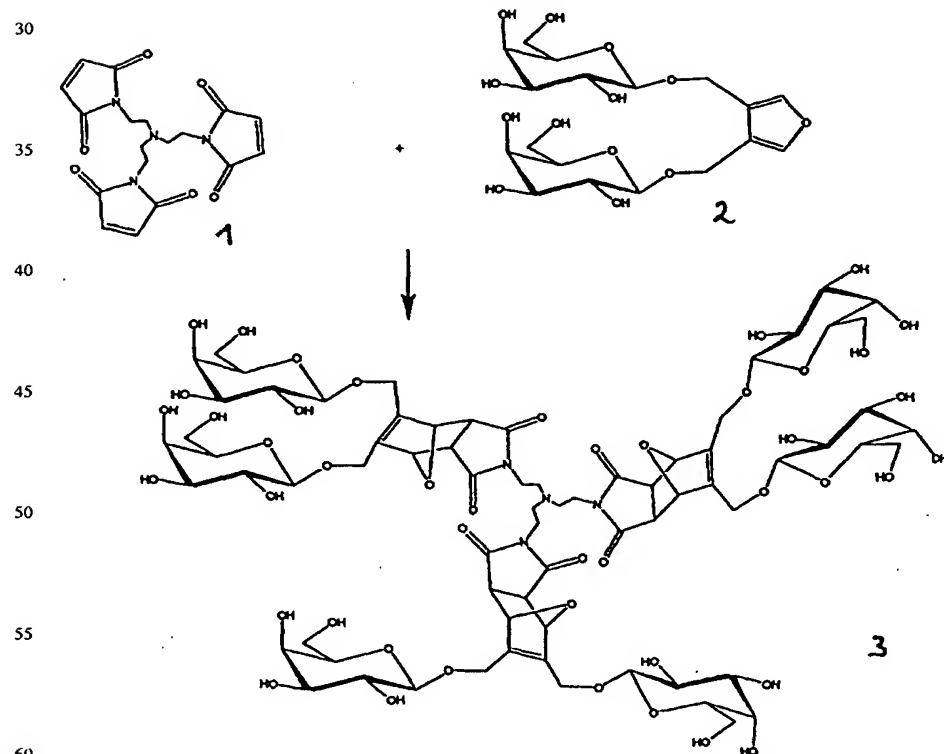


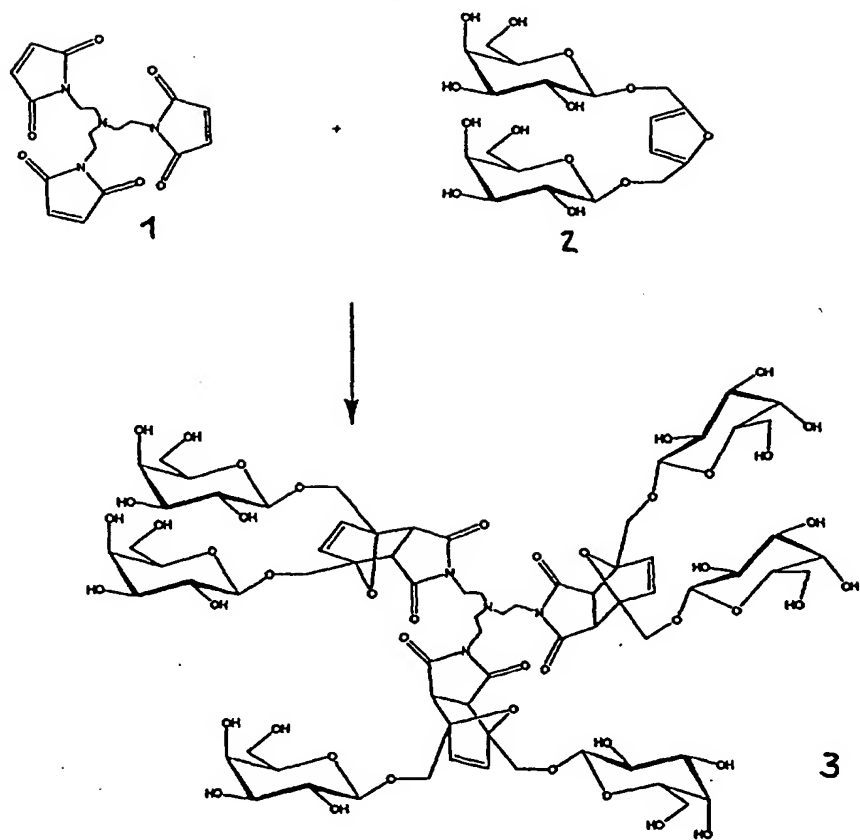
c) Umsetzung von 2,5 und 3,4-Glycosyl-hydroxymethylierten Furanen



Beispiel 4

Darstellung von Glycoclustern mittels Diels-Alder Reaktion



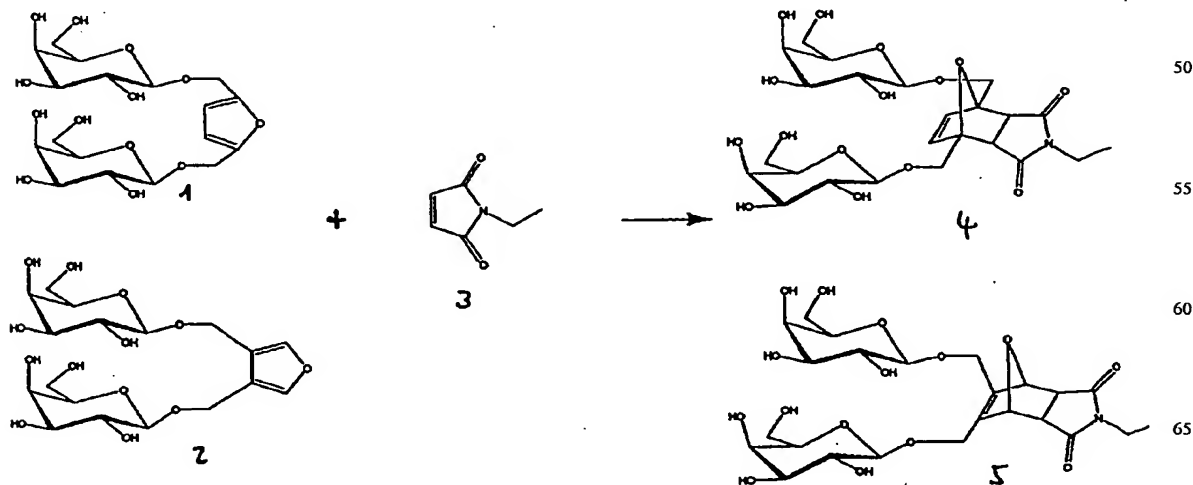


[0042] Eine Lösung von 50 μmol Tris(-2-Maleinimidoethyl)amin 1 (TMEA) und 190 μmol Bis-Galactosylfuran 2 in 1 ml Wasser wird 50 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Produktgemisch 3 (Kombination aus endo- und exo-Produkten) wird mittels HPLC in ca. 30% Ausbeute erhalten.

Beispiel 5

Gekreuzte Diels-Alder Reaktion

[0043] Hierbei handelt es sich um die gleichzeitige Reaktion von 2,5- und 3,4-Furanen mit einem Dienophil (\rightarrow Kombinatorik)

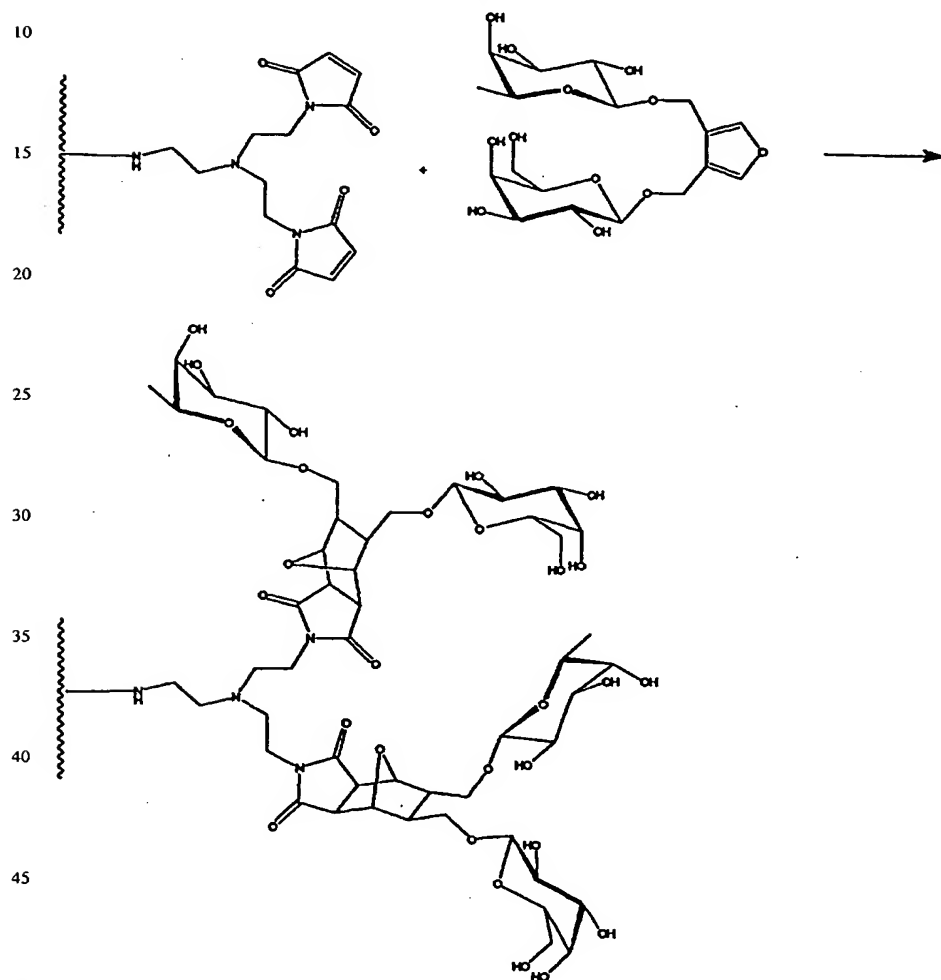


DE 100 41 221 A 1

[0044] 50 μ mol eines Gemischs der glycosidierten 3,4- und 2,5-Furane 1,2 (s. Beispiel 1) und 50 μ mol N-Ethyl-Maleinimid 3 werden in 1 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird bei Raumtemperatur gerührt. Der Fortgang der Reaktion wird mittels HPLC kontrolliert. Nach beendeter Umsetzung wird die Reaktionslösung gefriergetrocknet. Die Produkte 4 und 5 werden mittels präparativer HPLC isoliert. Ausbeute 50–60%.

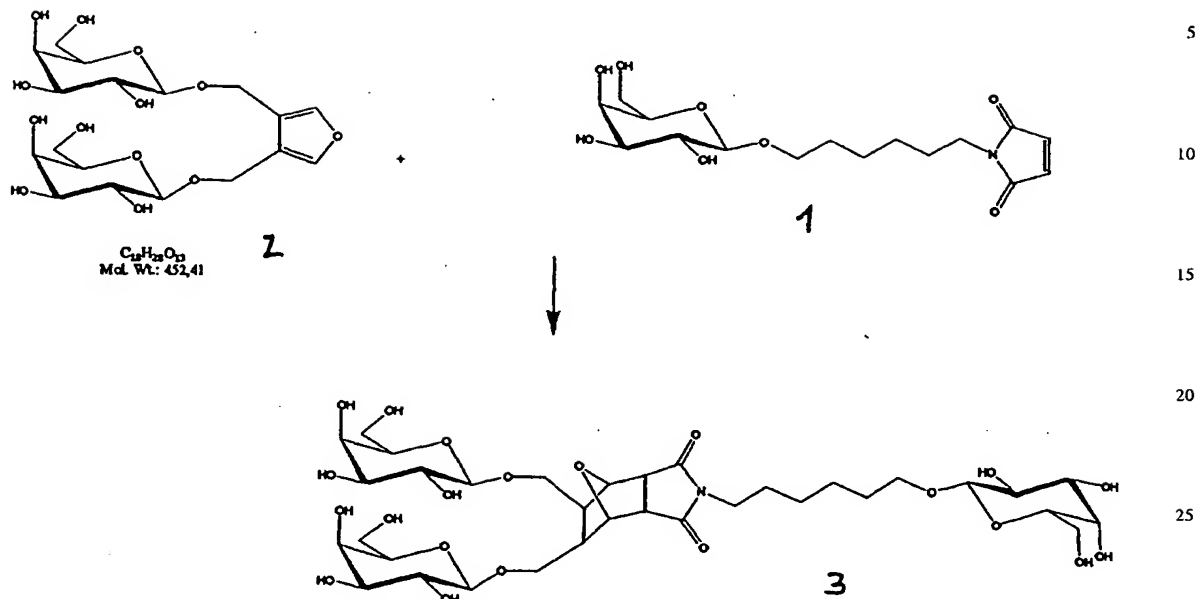
Beispiel 6

Diels-Alder Reaktion an der Festphase



[0045] 1,0 g Tris-(2-aminoethyl)amin-Polymer (Aldrich #47,210-7) werden in 20 ml Wasser für 1 Std. quellen gelassen. Danach wird in 20 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung aufgeschlämmt und bei 0°C mit 1080 mg Methoxycarbonylmaleimid versetzt und dann bei Raumtemperatur 16 Std. gerührt. Man stellt mit H_2SO_4 auf pH 3–4 ein, extrahiert mit Essigester und Dichlormethan. Die wässrige Phase wird getrocknet. Zu 100 mg des Produktes werden 108 mg glykosyliertes Furanderivat (s. Beispiel 1) in 3 ml Wasser gegeben. Es wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach 16 Stunden wird das Wasser entfernt und das Produkt mittels HPLC gereinigt.

Herstellung von Trisacchariden



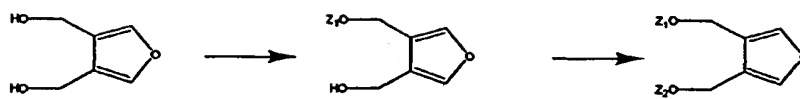
[0046] 5 mmol geeignet derivatisiertes Maleinimid 1 (Maleinimid + Spacer + Saccharid) werden mit 4,9 mmol diglycosyliertem Furan 2 in 100 ml Dichlormethan gelöst und bei -40°C mit 10 Tropfen Triflat versetzt. Es wird bei 0°C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wird die Reaktionslösung mit verdünnter Bicarbonatlösung und Wasser ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel wird über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedunstet. Der Rückstand wird an Kieselgel mit Petrolether/Essigester (2/1) chromatographiert. Ausbeute an Produkt 3: 54%.

Patentansprüche

- Verfahren zur Synthese von Saccharid-Verbindungen, das die folgenden Schritte aufweist:
 - Anknüpfung mindestens eines Saccharids an ein cyclisches oder acyclisches Dien,
 - Umsetzung des in Schritten (a) entstandenen Saccharid-enthaltenden Diens oder eines käuflich erhältlichen Saccharid-enthaltenden Diens mit einem Dienophil mittels Diels-Alder-Reaktion.
- Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Dien ein substituiertes Furan, Fulven, Furfural, Pyrrol, Pyrazol, Oxazol, Thiophen, Cyclopentadien, Cyclohexadien oder acyclisches 1,3-Dien ist.
- Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Dienophil ein Maleinsäure(anhydrid)-Derivat, Fumarsäure(anhydrid)-Derivat, Maleinimid-Derivat, Acrylsäure-Derivat, Acetylen-Derivat oder ein Enolether ist.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Dien und/oder Dienophil als Substituenten Alkylketten, OH, SH, Halogene, Aryl-, Carboxyl-, Nitro-, Carboxyamido-, Keto-, Sulfoxid-, Sulfon-, Sulfonsäure-, Phosphorsäure-, Amino-Gruppen, Aminosäuren- bzw. Peptid-Substituenten, Oligonukleotid- bzw. Nukleinsäure-Substituenten, Lipid-Substituenten, Saccharide, pharmazeutische Wirkstoffe, Markierungen, Komplexe oder Farbstoffe tragen.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei in Schritt (a) das Saccharid mit dem cyclischen Dien verknüpft wird, indem das Dien mit einer Imidat-Komponente umgesetzt wird, die mit einem Saccharid substituiert ist.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Dien eine cyclisches Dien ausgewählt aus 2,3-Bishydroxymethylfuran, 3,4-Bishydroxymethylfuran, 2,5-Bishydroxymethylfuran oder ein Derivat von α -GMF mit modifizierter Aldehydfunktion ist.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das mit einem Saccharid modifizierte Imidat Tri-O-Benzoyl-fucoseimidat oder Tetra-O-Benzoylgalactoseimidat ist.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das in Schritt a) erhaltene Produkt 3,4-Bis-(fucosyl-oxymethyl)-furan, 3,4-Bis-(galactosyl-oxymethyl)-furan, 3-galactosyl-hydroxymethyl-4-fucosyl-hydroxymethylfuran, 3-Fucosyl-4-fucosyl-3,4-bis-hydroxymethylfuran, 3-Fucosyl-4-galactosyl-3,4-bis-hydroxymethylfuran, 2-Galactosyl-5-galactosyl-2,5-bis-hydroxymethylfuran oder 2,5-Bis-(galactosyl-oxymethyl)-furan ist.
- Verfahren nach Anspruch 4, wobei der Substituent ein Biotinrest oder ein Lysinrest ist.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -



Z₁ = Saccharid 1

Z₂ = Saccharid 2

Fig. 1

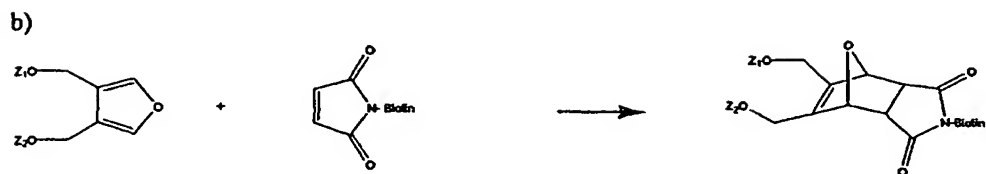
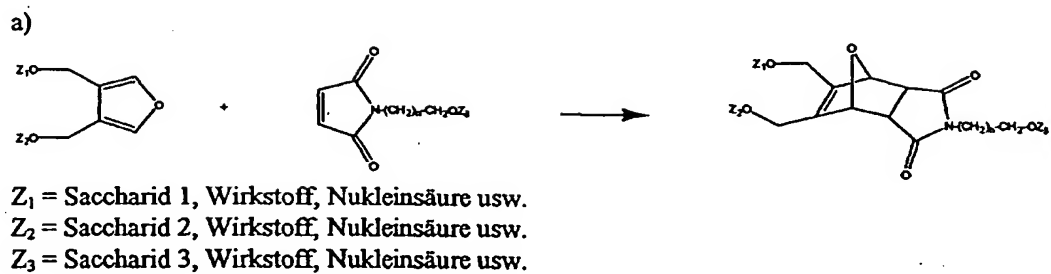


Fig. 2

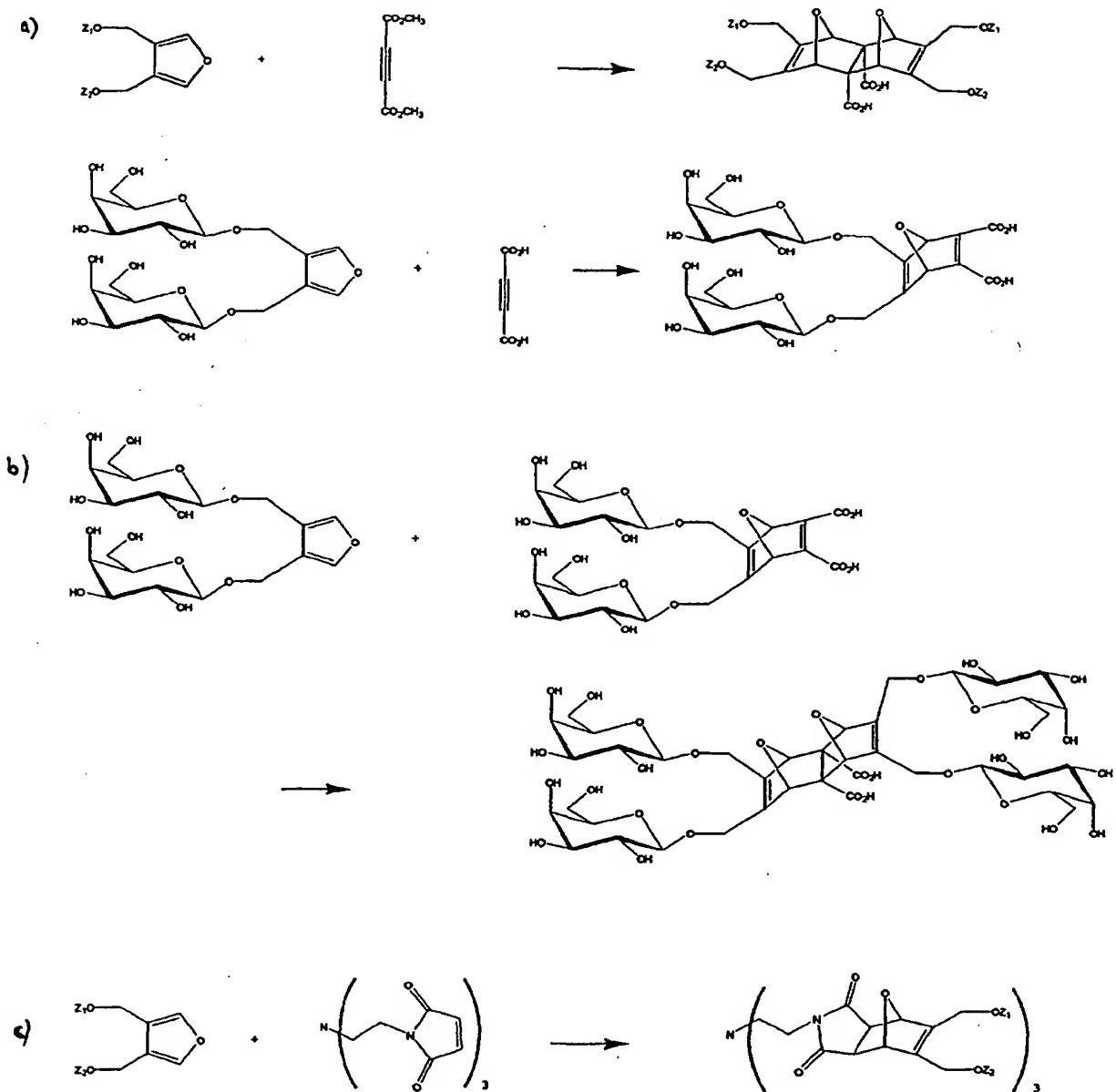


Fig. 3

Weitere Bausteine für die DA-Reaktion

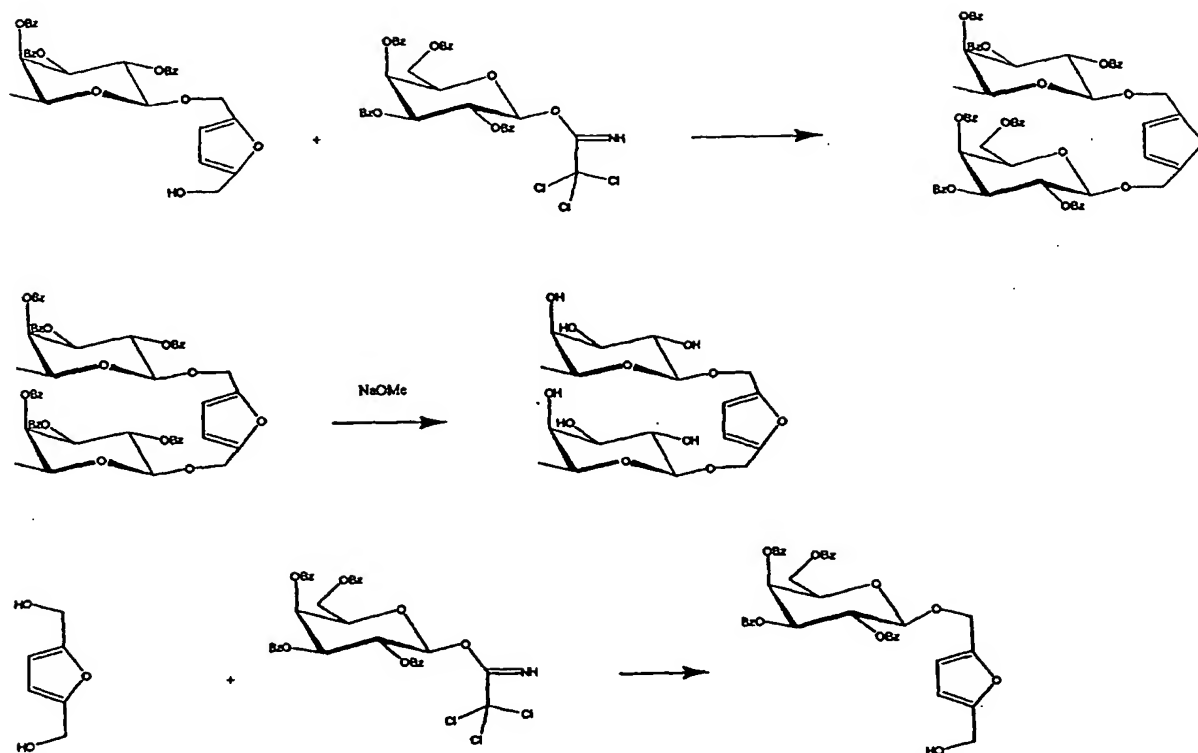


Fig. 4